

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 7 月 5 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850214

研究課題名(和文) イヌiPS細胞や体性幹細胞由来肝組織による薬物代謝評価系の確立

研究課題名(英文) In vitro assessment of canine tissue stem cells or iPS-derived hepatocyte-like cells to investigate their potential in drug metabolism evaluation

研究代表者

根尾 櫻子 (Neo, Sakurako)

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号：50532107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：イヌiPS細胞や体性幹細胞を用いて、生体外で三次元肝組織を作製し、新規薬物代謝及び毒性試験の可能なスクリーニングチップとして確立する。iPSや体性幹細胞をソースとすることで、生体外では長期生存が不可能である肝細胞培養系の問題点を克服し、培養肝細胞・組織の安定供給を図る。このような薬物スクリーニングチップは、創薬研究での動物実験代替法となり、また個人差のある肝代謝を生体外で再現することで、重篤な薬物毒性の危険性を排除できる利点がある。本研究は獣医学のみならず、医学、創薬の推進を大きく促すはずである。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of reducing animal testing and to construct an alternative method to animal testing in drug discovery research, we designed a basic investigation to create drug screening chips using induced hepatocyte-like cells (iHep). Tissue stem cells were used to induce hepatocyte-like cells which could be maintained over a long period, with preservation of differentiated functions. Canine bone marrow was used for the cell source and was cultured with human placental hydrolysate in order to induce hepatocyte-like cells. Contrary to expectations, iHep retained expression of hepatocyte specific markers in mRNA and protein, and maintained lipid and drug metabolism for more than 2 months. In conclusion, bone marrow derived iHeps are a potential source for drug screening chips.

研究分野：獣医臨床病理学、再生医療、獣医内科学

キーワード：肝再生 犬 胎盤抽出液 長期培養 骨髄

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、さまざまな薬物の代謝および解毒を担う重要な臓器である。医薬品開発においては、医薬候補物質のスクリーニング用実験動物として主にマウスやラットが用いられているが、臨床応用する際に重要な急性毒性や薬物動態に関する適切な成績が得られないことが多い。そのため、これまで人での臨床試験前に行う毒性試験では、実験動物としてイヌが用いられてきた。しかしながら、動物愛護の観点からイヌを実験動物として用いることは世界的に制限されており、早急に代替法を開発する必要性が訴えられている。そこで、*in vitro*での解毒能や薬物動態を評価するために「**培養肝細胞を用いた薬物代謝試験法の確立**」を行うことは、緊急かつ最重要課題であると考えられる。

最近、マウスやヒトの iPS 細胞から肝細胞の分化誘導に成功したことが報告され<sup>1)2)</sup>、*in vitro*における薬物代謝評価システムの確立に期待が高まっている。**イヌの iPS 細胞もすでに樹立されている**が肝細胞誘導には至っていない<sup>3)4)</sup>。肝細胞培養の難点は、二次元培養しても急激に機能が減衰し、細胞が消失することであった。ところが近年、肝細胞を三次元培養にて立体的に再生すると、アルブミンの高発現、長期培養の維持、薬物代謝酵素 (CYP) の適正な発現が認められることが相次いで報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、体性幹細胞および iPS 細胞からの肝三次元培養に関わる基盤技術を開発し、生体外では長期生存が不可能である肝細胞培養系の問題点を克服し、培養肝細胞・組織の安定供給を図ることである。

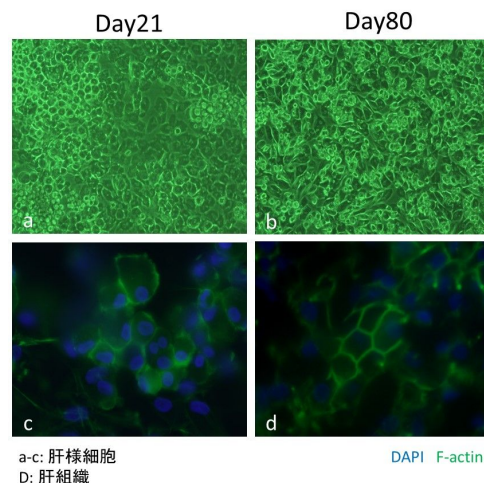
### 3. 研究の方法

長期培養を行うために、以前イヌの骨髄および脂肪組織から肝様細胞への誘導を成功させる際に用い、長期培養に有効な可能性が

考えられた、ヒト胎盤抽出液に注目し、検討に用いた。犬の体性幹細胞を含む犬骨髄細胞を採材・分離し、10%FBS 添加 HGM 培地を用いて、EGF およびヒト胎盤抽出液を添加し、5%CO<sub>2</sub> 存在下、37℃ で培養し、分化誘導を行った。得られた肝様細胞は、まず形態学的に観察し、次に定性的および定量的 PCR とマイクロアレイによる遺伝子発現の検討を行い、さらに免疫細胞化学によってタンパク発現を確認した。また、脂質代謝能と薬物代謝活性を調べることで肝細胞類似機能の有無に関しても検討した。三次元化の試みは、本邦で開発された最先端技術である、「温度応答培養皿」を用い、骨髄細胞から二次元的に誘導した肝細胞のシートを三次元組織化することに着手した。

### 4. 研究成果

#### A. 形態 (位相差顕微鏡、F-Actin 蛍光染色)

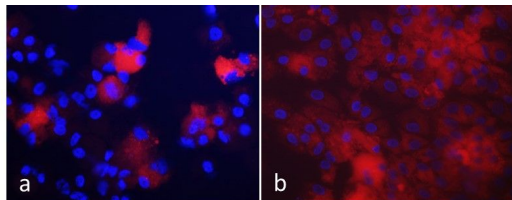


骨髄由来肝様細胞は、培養 21 日目に多角形細胞 (肝様細胞) が認められた。さらに培養 80 日目も形態が維持されていた。これらのことから、骨髄から分化誘導した肝様細胞は、長期培養できる可能性が示唆された。

#### B. 機能解析 (脂質代謝能、薬物代謝能)

【脂質代謝能】LDL 取り込み能の解析を行った。LDL は細胞内で代謝されると、赤色蛍光色素 Dil が遊離し、細胞内に蓄積される。

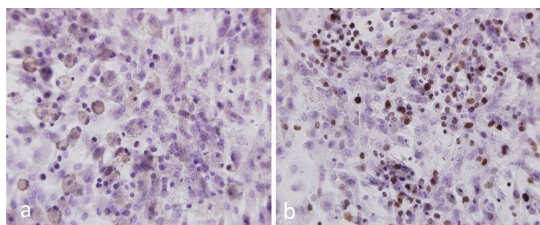
【薬物代謝活性】Pentoxiresorufin は、CYP450 に代謝され、赤色蛍光化合物 Resorufin を産生する。



培養80日目における、a. 脂質代謝能および、b. 薬物代謝活性

長期培養下においても約 90%の細胞が脂質代謝能および薬物代謝活性を維持することが明らかになり、創薬研究への可能性が示唆された。

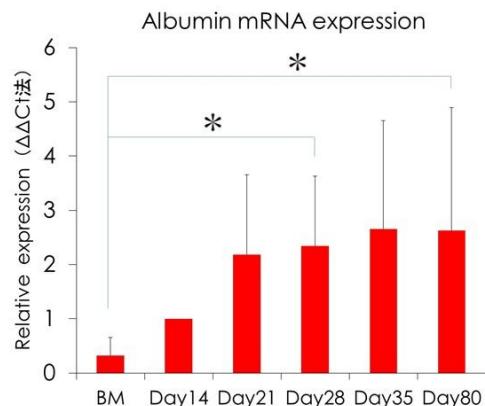
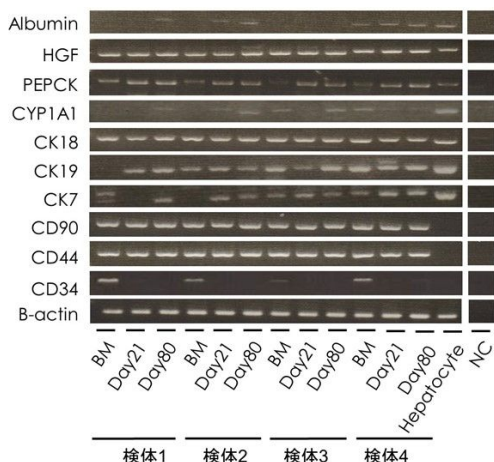
### C. 免疫細胞化学



培養21日目の肝様細胞における a. アルブミンと b. Ki67の発現

肝細胞への分化を示す肝様細胞と同時に、小型の増殖活性が高い細胞が見られ、これらが長期培養を可能にしている可能性が考えられた。

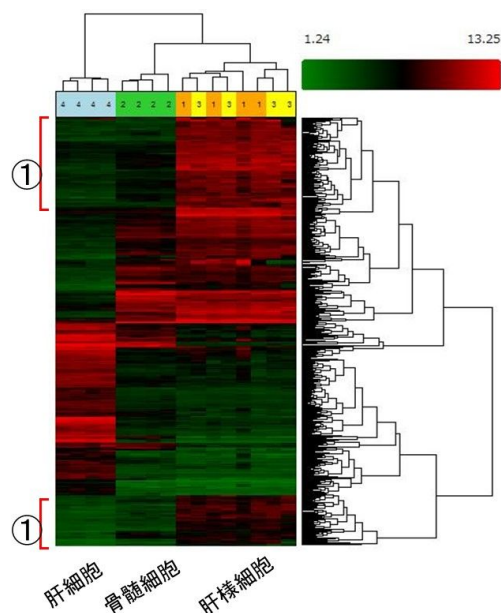
### D. 定性的および定量的 PCR



骨髄由来肝様細胞は、定性的 PCR で成熟肝細胞マーカー (Albumin、HGF、CK18)、薬物代謝酵素 (CYP1A1)、糖新生マーカー (PEPC) および肝前駆細胞マーカー (CD90、CD44) の mRNA を発現し、Albumin の定量的 PCR では、骨髄細胞と比較して発現量が高くなることを確認した。また、長期培養においても発現が維持された。以上より、骨髄由来肝様細胞は、長期間培養した状態でも肝前駆および成熟細胞の性質を持つことが確認された。

### E. マイクロアレイ

肝細胞と骨髄由来肝様細胞に同程度の発現が認められた遺伝子ならびに肝様細胞に特徴的な遺伝子を検出した。



薬物代謝関連遺伝子
CYP1A1
CYP1B1
CYP2U1
CYP7B1

脂質・コレステロール代謝 関連遺伝子
APOE(apolipoprotein E)
ACSS3(acyl-CoA synthetase)
ABCA9(ATP-binding cassette)
LCAT(lecithin-cholesterol acyltransferase)
LDLR(low density lipoprotein receptor)
SOAT1(sterol O-acyltransferase 1)

糖代謝関連遺伝子
PC(pyruvate carboxylase)
PK4(pyruvate dehydrogenase kinase)
PGM5(phosphoglucomutase 5)
SLC37A2(glycerol-3-phosphate transporter)

肝細胞と骨髄由来肝様細胞に同程度の発現が認められた遺伝子

①の骨髄由来肝様細胞のみに 発現した遺伝子
FAM114A1(family with sequence similarity 114, member A) *
LAMA(laminin) *
NNAT(neuronatin) *
NRP2(neuropilin 2) *
PMP22(peripheral myelin protein 22) *
PRRX1(paired related homeobox 1) †
MEOX2(mesenchyme homeobox 2) †
MYO10(myosin X) †

\* 神経細胞関連遺伝子

† 筋細胞関連遺伝子

骨髄由来肝様細胞は、薬物代謝、脂質・コレステロール代謝、糖代謝関連遺伝子の中に肝細胞と同程度の発現が認められる遺伝子が存在したが、神経細胞および筋細胞関連遺伝子の発現も認められた。これらのことより、骨髄細胞から肝様細胞への分化は確認されたが、同時に神経細胞や筋細胞への分化の可能性も示唆された。

#### <引用文献>

1. Yu Y, et al. Sten Cell Res. 9: 196-207. 2012

2. Zang Q, et al. Chin Med J (Engl) 124: 3786-3793. 2011
3. Shimada H, et al. Mol Reprod Dev. 77:2. 2010
4. Luo J, et al. Stem Cells Dev. 20:1669-1678. 2011

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

牧石恵理、イヌ骨髄細胞から分化誘導した肝様細胞の長期培養の試み、第 24 回肝細胞研究会、2011 年 6 月 29 日、30 日、「札幌医科大学臨床教育研究棟 (札幌)」

根尾櫻子、イヌ骨髄細胞から分化誘導した肝様細胞の長期培養の試み、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年、9 月 14 - 16 日、「岩手大学 (盛岡)」

根尾櫻子、イヌ骨髄細胞から分化誘導した肝様細胞の長期培養の試み、第 12 回再生医療学会、2013 年、3 月 21 - 23 日、「パシフィコ横浜 (横浜)」

牧石恵理、マイクロアレイを用いたイヌ骨髄細胞由来肝様細胞における遺伝子発現の検討、第 13 回再生医療学会、2014 年、3 月 4 - 6 日、「国立京都国際会館 (京都)」

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

根尾 櫻子 (NEO Sakurako)

麻布大学・獣医学科・助教

研究者番号：50532107

(4) 研究協力者

赤池敏弘 (AKAIKE Toshihiro)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科  
名誉教授

沓澤好一 (KUTSUZAWA Koichi)

東京理科大学・総合研究機構・ポストド  
クトラル研究員

折戸謙介 (ORITO Kensuke)

麻布大学・獣医学科・教授